

医学博士 八木國夫君の「フラビン酵素に関する研究」に対する

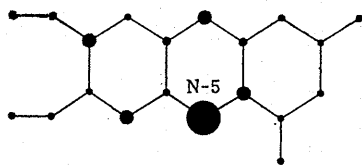
授賞審査要旨

八木國夫君はフラビンおよびフラビン酵素に関する幅広い業績をあげたが、その中で特に注目すべきものはフラビン酵素の一種であるD-アミノ酸化酵素を用いて、いわゆる「ミハリス学説」によって予言されていた酵素と基質との複合体を初めて結晶化し、その実態を明らかにして、酵素の反応のメカニズムの解明に重要な貢献をしたことである。

同君はまず上記の酵素を精製し、これに基質のモデルとして基質と同様に酵素と結合はするのに酵素の作用を受けない物質である安息香酸を混合して、いわゆる酵素基質複合体（ミハリス複合体）のモデルを結晶化することに初めて成功した。⁽¹⁾さらに真の酵素基質複合体を結晶化しようと企て、同君は一定濃度の反応生成物すなわちピルビン酸とアンモニアの共存する状態で酵素と基質であるD-アラニンとを反応させれば、酵素基質複合体が蓄積すると推定して実験を行った。その結果、嫌氣的条件下で酵素は黄色から紫色に変わり、このものを硫酸アンモニウム0.05 飽和の下に0~5°Cに保つと紫色の結晶が生成沈殿してくることを見出した。⁽²⁾この結晶は酸素に触れると酸化型酵素と等モルのピルビン酸を生じるので、等モルの酵素と基質より成ることがわかった。⁽³⁾さらにこの結晶と迅速な反応で認められる反応中間体とを吸収スペクトル的に同定した。⁽⁴⁾この結晶は酵素基質複合体として世界で初めて結晶化されたもので

あり、同時にミハエリス学説で述べられた酵素基質複合体の生成を実証したものであるということが出来る。ついで、この複合体の実態を知るべく種々の物理化学的手法で検討を加えたが、強力な光線に不安定な為、エックス線解析に耐えないことが判明すると同時に、光照射により酵素ならびに基質のラジカルに分解することがわかった。^(5,6,6,7) この酵素側ラジカルはフラビンのセミキノンを有しており、このものを結晶状に得ることに成功している。⁽⁶⁾ これを端緒として、長波長領域吸収スペクトル⁽⁵⁾、電子スピン共鳴⁽⁶⁾、円偏光二色性等で検索の結果、この実態が強い電荷移動複合体であることを見出した。なお、この複合体の基質部分の状態を知る為、アミノ酸の α -プロトンの遊離の状態⁽⁹⁾、機作的同位体効果⁽¹⁰⁾、アミノ酸の置換基効果等を解析し、基質部分がカルバニオン状態をとっていることを明らかにした。同時に酸化型フラビンにおける最外殻軌道の大きさを計算し、図の如くフラビンのイソアロキサジン核の五位の窒素が最も電子を受けとり易いことを知り、カルバニオンのアミノ基とイソアロキサジン核の五位の窒素との間に電子移動相互作用が存在することを推定した。⁽¹²⁾ この酵素基質複合体が強い電荷移動複合体の状態であるの寿命を持ち得るのは酵素タンパク部分の疎水域の寄与によるものであることを明らかにし、^(13,14) この電荷移動複合体が酸素と反応する本体である点から、こうしたタンパク部分の疎水性が酵素反応を容易にさせていることを明らかにした。

基質より酵素への電子の移動はフラビンのイソアロキサジン核と酵素タンパク部分または周囲の水との水素結合により起り易くなることをモデル実験によって証明した。^(15,16) さらに核磁気共鳴による酵素反応の解析を行う為、C-13



核およびニコチン核を多量に含むフラビン類を合成し、その酸化および還元状態の化学シフト値を分析した。^(17, 18, 19) その結果、還元型フラビン酵素と酸素との反応部位が B₁₂ 位であることに実験的根拠を提出している。⁽¹⁹⁾

上記の紫色の酵素基質複合体は電荷移動複合体であることが判明したので、電荷移動の起る前の酵素基質複合体が存在しなければならぬが、最近に到り、110°C において酵素と基質を反応させることにより、その存在を吸収スペクトル的に証明した。⁽²⁰⁾

その他、フラビン酵素に関する主なる業績を列記すれば次の如くである。

(a) モノアミン酸化酵素を牛心筋ミトコンドリアより精製し、この酵素の基質特異性に脂質が著しい影響を与えることを見出した。⁽²¹⁾

(b) 動物に放射性リボフラビンを注射して共有結合型フラビン酵素に取り込ませ、これを指標として共有結合型フラビン酵素を検出、精製する方法を考案した。⁽²²⁾

(c) 共有結合型フラビン酵素であるガラクトノラクトン酸化酵素およびコリン酸化酵素のフラビン部分の構造を決定した。^(24, 25)

これらの成果は専門誌に発表されると共に国際生化学会議やフラビンおよびフラビン酵素に関する国際会議等で報告され、国際的に高く評価されたもので、酵素学の発展に功績顕著なるものがあると認めらる。

一、主要な論文目録

1. K. Yagi, T. Ozawa: Complex Formation of Apoenzyme, Coenzyme and Substrate of D-Amino

Acid Oxidase III. Crystallization of Artificial Michaelis Complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 56, 420 (1962).

2. K. Yagi, T. Ozawa: Mechanism of Enzyme Action I. Crystallization of Michaelis Complex of D-Amino Acid Oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 81, 29 (1964).
3. K. Yagi, M. Nishikimi, N. Ohishi, K. Hiromi: Spectrophotometric Identification of the Purple Complex as an Intermediate of the Reaction of D-Amino-Acid Oxidase Using Stopped-Flow Technique. *J. Biochem.* 65, 663 (1969).
4. K. Yagi, M. Nishikimi, N. Ohishi: Identity of the Rapidly Appearing Purple Intermediate of D-Amino Acid Oxidase. *J. Biochem.* 72, 1369 (1972).
5. K. Yagi, K. Okamura, M. Naoi, N. Sugitara, A. Kotaki: Mechanism of Enzyme Action II. Characterization of the Purple Intermediate in the Anaerobic Reaction of D-Amino Acid Oxidase with D-Alanine. *Biochim. Biophys. Acta* 146, 77 (1967).
6. K. Yagi, N. Sugitara, K. Okamura, A. Kotaki: Mechanism of Enzyme Action III. Crystallization of the Semiquinoid Form of D-Amino Acid Oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 151, 343 (1968).
7. K. Yagi, N. Ohishi: Effect of Light on the Purple Complex of D-Amino Acid Oxidase. *J. Biochem.* 67, 599 (1970).
8. A. Kotaki, N. Sugitara, K. Yagi: Circular Dichroic Spectra of D-Amino-Acid Oxidase and its Complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 151, 689 (1968).
9. K. Yagi, M. Nishikimi, A. Takai, N. Ohishi: Release of α -Amino Acid as Primary Product in D-Amino Acid Oxidase Reaction. *Biochim. Biophys. Acta* 212, 243 (1970).

10. K. Yagi, M. Nishikimi, A. Takai, N. Ohishi: Mechanism of Enzyme Action VI. Kinetic Isotope Effect on D-Amino Acid Oxidase Reaction. *Biochim. Biophys. Acta* 321, 64 (1973).
11. K. Yagi, M. Nishikimi, A. Takai, N. Ohishi: Additional Evidence for the Liberation of Substrate α -Hydrogen Prior to Reduction of the Coenzyme in D-Amino Acid Oxidase Reaction. *J. Biochem.* 76, 451 (1974).
12. P.-S. Song, J. D. Choi, R. D. Fugate, K. Yagi: Nature of the N-5 Reactivity in Enzymatic and Photochemical Oxidations by Flavins. Flavins and Flavoproteins (ed. by T. P. Singer), P. 381, Elsevier, Amsterdam (1976).
13. M. Naoi, A. Kotaki, K. Yagi: Structure and Function of D-Amino Acid Oxidase VII. Interaction of Hydrophobic Probes with D-Amino Acid Oxidase. *J. Biochem.* 74, 1097 (1973).
14. K. Yagi, F. Tanaka, N. Ohishi, M. Morita: Effect of Hydrophobic Probes on the Higher Structure of D-Amino Acid Oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 492, 112 (1977).
15. K. Nishimoto, Y. Watanabe, K. Yagi: Hydrogen Bonding of Flavoprotein I. Effect of Hydrogen Bonding on Electronic Spectra of Flavoprotein. *Biochim. Biophys. Acta* 526, 34 (1978).
16. K. Yagi, N. Ohishi, K. Nishimoto, J. D. Choi, P.-S. Song: Effect of Hydrogen Bonding on Electronic Spectra and Reactivity of Flavins. *Biochemistry* 19, 1553 (1980).
17. K. Yagi, N. Ohishi, A. Takai, K. Kawano, Y. Kyogoku: ^{13}C -NMR Study of Flavins and Flavoproteins (ed. by T. P. Singer), P. 775, Elsevier, Amsterdam (1976).
18. K. Yagi, N. Ohishi, A. Takai, K. Kawano, Y. Kyogoku: ^{15}N Nuclear Magnetic Resonance of Flavins. *Biochemistry* 15, 2877 (1976).
19. K. Kawano, N. Ohishi, A. T. Suzuki, Y. Kyogoku, K. Yagi: Nitrogen-15 and Carbon-13

- Nuclear Magnetic Resonance of Reduced Flavin. Comparative Study with Oxidized Flavin. *Biochemistry* **17**, 3854 (1978).
20. K. Yagi, R. Lange, P. Douzou: Spectroscopic Demonstration of an Initial Stage of the Complex of D-Amino Acid Oxidase and its Substrate D- α -Aminobutyric Acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **97**, 370 (1980).
21. M. Naoi, K. Yagi: Effect of Phospholipids on Beef Heart Mitochondrial Monoamine Oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **205**, 18 (1980).
22. K. Yagi, Y. Nakagawa, O. Suzuki, N. Ohishi: Incorporation of Riboflavin into Covalently-bound Flavins in Rat Liver. *J. Biochem.* **79**, 841 (1976).
23. K. Yagi: Enzyme Having Covalently Bound Flavins. *Frontiers of Bioorganic Chemistry and Molecular Biology* (ed. by S. N. Ananichenko), P. 35, Pergamon Press, Oxford (1980).
24. W. C. Kenney, D. E. Edmondson, T. P. Singer, M. Nishikimi, E. Noguchi, K. Yagi: Identification of the Covalently Bound Flavin of L-Galactonolactone Oxidase from Yeast. *FEBS Letters* **97**, 40 (1979).
25. N. Ohishi, K. Yagi: Covalently Bound Flavin as Prosthetic Group of Choline Oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **86**, 1084 (1979).